

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.08.005

来氟米特通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导大鼠系膜细胞凋亡的作用

李豫江¹, 张伟¹, 赵磊^{2△}

(1. 石河子大学医学院第一附属医院普外二科, 新疆石河子 832000;

2. 石河子大学医学院生理教研室, 新疆石河子 832000)

[摘要] **目的** 探讨来氟米特(A771726)对大鼠肾小球系膜细胞凋亡的影响及可能机制。**方法** 体外培养大鼠肾小球系膜细胞,分为正常对照组(加入含5%胎牛血清的DMEM培养液)、A771726组(在对照组基础上加入A771726,使其终浓度为50 μg/mL)、LY294002组(在正常对照组基础上加入LY294002,使其终浓度为2 μg/mL)、LY294002+A771726组(先加2 μg/mL的LY294002干预系膜细胞4 h后,加入50 μg/mL的A771726),采用流式细胞术检测各组干预48 h后对大鼠肾小球系膜细胞凋亡的影响,采用免疫荧光法检测各组干预48 h对大鼠系膜细胞中mTOR蛋白表达的影响,采用免疫印迹法检测各组干预48 h后对大鼠系膜细胞中Caspase-3表达的影响。**结果** 与正常对照组比较,A771726、LY294002、LY294002+A771726组大鼠肾小球系膜细胞的凋亡率均明显升高,mTOR蛋白表达均明显降低,Caspase-3蛋白表达均明显增加;与A771726组比较,LY294002、LY294002+A771726组大鼠肾小球系膜细胞的凋亡率均明显升高,mTOR蛋白表达均明显降低,Caspase-3蛋白表达均明显增加;与LY294002组比较,LY294002+A771726组大鼠肾小球系膜细胞的凋亡率明显升高,mTOR蛋白表达明显降低,Caspase-3蛋白表达明显增加。**结论** 来氟米特可能通过下调PI3K/Akt/mTOR信号通路而诱导大鼠肾小球系膜细胞的凋亡,且来氟米特可协同LY294002共同诱导大鼠系膜细胞的凋亡。

[关键词] 肾小球系膜细胞;来氟米特;细胞凋亡;PI3K/Akt/mTOR信号通路

[中图分类号] R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)08-1022-04

Effect of leflunomide on rat mesangial cells apoptosis by PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

Li Yujiang¹, Zhang Wei¹, Zhao Lei^{2△}

(1. Department of 2nd General Surgery, First Affiliated Hospital of the Medical College Shihezi University, Xinjiang 832000, China; 2. Department of Physiology, Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of leflunomide(A771726) on the apoptosis of the rat glomerular mesangial cells and its possible mechanism. **Methods** The cultured rat glomerular mesangial cells were divided into the normal control group (adding DMEM culture solution containing 5% fetal calf serum), A771726 group(adding 50 A771726 on the basis of control group, making it a concentration as 50 μg/mL), LY294002 group (adding LY294002 on the basis of normal control group, making its final concentration as 2 μg/mL) and the LY294002+A771726 group(first adding 2 μg/mL LY294002 to interfere the mesangial cells for 2 h, then adding A771726 50 μg/mL). After 48 h intervention, its influence on mesangial cell apoptosis in each group were measured by flow cytometry. The expression of mTOR was measured by immunofluorescence. The expression of Caspase-3 was measured by Western-blot. **Results** Compared with the normal control group, the apoptosis rate of rat glomerular mesangial cells in the A771726 group, LY294002 group and LY294002+A771726 group were significantly increased, the expression of mTOR was decreased, the expression of Caspase-3 was increased; compared with the A771726 group, the apoptosis rates of rat glomerular mesangial cells in the LY294002 group and LY294002+A771726 group were significantly increased, the expression of mTOR was significantly decreased, the expression of Caspase-3 was significantly increased; compared with the LY294002 group, the apoptosis rate of rat glomerular mesangial cells in the LY294002+A771726 group was significantly increased, the expression of mTOR was significantly decreased, while the expression of Caspase-3 was significantly increased. **Conclusion** Leflunomide may induce the rat mesangial cells apoptosis through down-regulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, moreover, leflunomide may synergize with LY294002 to induce rat mesangial cells apoptosis.

[Key words] mesangial cells; leflunomide; cells apoptosis; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

资料显示,我国慢性肾脏病的主要病因仍然是慢性肾小球肾炎,而其中又以系膜增生性肾小球肾炎的发病率最高。来氟米特(leflunomide, LEF)是一种新型免疫抑制剂,其药理作用主要是口服后在胃肠道和肝脏分解代谢为活性代谢产物A771726而发挥药理作用^[1]。大量体内外实验研究发现:LEF

具有抗炎、抗增殖、诱导细胞凋亡的作用^[2-4],但是具体机制不清楚。研究证实PI3K/Akt/mTOR信号通路参与细胞的增殖、凋亡的调节,通过通路下游凋亡蛋白而诱导细胞的凋亡^[5]。2013年12月至2014年10月本课题组通过观察PI3K/Akt/mTOR信号通路在来氟米特对大鼠系膜细胞凋亡中的作用,

从而为临床上治疗进展性肾小球肾炎提供依据。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞株 大鼠肾小球系膜细胞株(HBZY-1)购自武汉博士德生物工程有限公司,保持了正常大鼠系膜细胞的形态与功能。

1.1.2 主要试剂 来氟米特活性代谢产物 A771726 (Sigma 公司)、LY2940002(Sigma 公司)、低糖 DMEM 培养基(Gibco 公司)、无支原体胎牛血清(杭州四季青)、胰蛋白酶(Amresco 公司)、AnnexinV-FITC 凋亡试剂盒(Invitrogen 公司)、PBS(上海生工生物)、兔抗大鼠 mTOR 单克隆抗体(Santa Cruz 公司)、兔抗大鼠 Caspase-3 单克隆抗体(Santa Cruz 公司)、罗丹明标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥)。

1.2 仪器 流式细胞仪(德国 Partec 公司)、倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)、离心机(美国 Thermo 公司)、细胞培养箱(美国 Thermo 公司)、激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司)、GEL-DOC2000 凝胶电泳成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 大鼠肾小球系膜细胞培养方法参照赵丹等^[6]的细胞培养方法。

1.3.2 实验分组 收集对数期大鼠肾小球系膜细胞,计数后接种于培养板中,待细胞完全贴壁,弃完全培养基,加入无血清 DMEM 培养液同步化 24 h,按实验要求分为正常对照组(加入含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养液)、A771726 组(在对照组基础上加入 A771726,使其终浓度为 50 μg/mL)、LY294002 组(在正常对照组基础上加入 LY294002,使其终浓度为 2 μg/mL)、LY294002+A771726 组(先加 2 μg/mL 的 LY294002 干预系膜细胞 4 h 后,加入 50 μg/mL 的 A771726),各组均干预 48 h。各组加药浓度和剂量根据本课题组前期预实验和相关文献报道而定。

1.3.3 大鼠肾小球系膜细胞凋亡检测 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板内,每孔 2 mL,按照实验分组干预 48 h,收集细胞,PBS 洗涤 2 遍,严格按照 AnnexinV-FITC 凋亡试剂盒操作步骤,用流式细胞仪检测各组人肾小球系膜细胞的凋亡,实验重复 3 次。

1.3.4 免疫荧光法检测各干预组系膜细胞中 mTOR 蛋白的表达 大鼠系膜细胞以 2×10^4 个/mL 接种于提前放有无菌盖

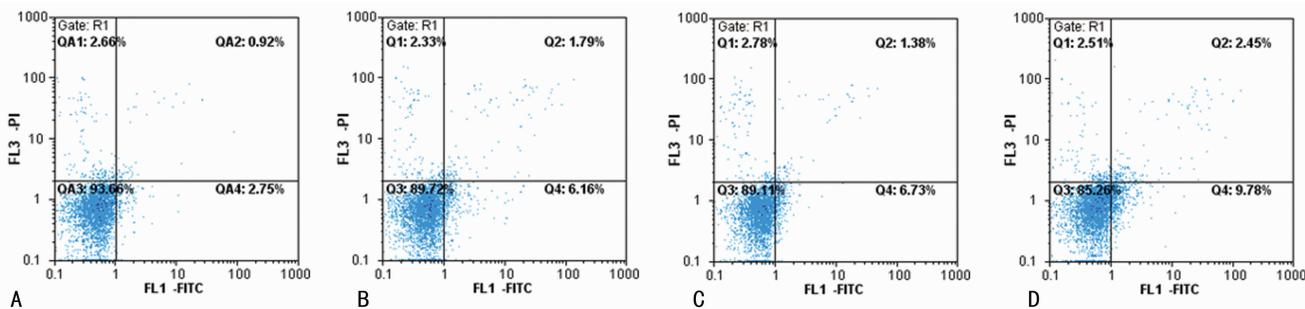
玻片的 24 孔板内,每孔 1 mL,按照实验分组干预培养 48 h。48 h 后取出细胞爬片,用 PBS 浸洗 2 次后,冷丙酮固定 10 min,接着用 10% 正常山羊血清封闭室温封闭 30 min。向盖玻片细胞面滴加 mTOR 一抗(1:100),4 °C 湿盒孵育过夜。过夜后向盖玻片细胞面滴加罗丹明标记山羊抗兔 IgG,稀释浓度为 1:100,室温避光孵育 2 h。最后用 50% 甘油缓冲液封片。每一步后均用 PBS 浸洗 3 次,每次 5 min。最后用激光共聚焦显微镜观察并扫面成像。

1.3.5 免疫印迹法检测各组干预 48 h 后 Caspase-8 蛋白的表达情况 大鼠系膜细胞以 1×10^6 个/mL 接种于 6 孔板中,每孔 2 mL,按照实验分组干预 48 h 后,用 PBS 洗涤 2 次,加入细胞裂解液,冰上静置 30 min 后,12 000 r/min 离心 25 min,取上清液,统一蛋白浓度为 10 g/L,100 °C 蛋白变性后待用。每孔每次加样 10 μL,在 SDS-PAGE 凝胶中电泳分离,半干转法将蛋白从凝胶中转移至 PVDF 膜上,4 °C 冰箱中用 5% 脱脂奶粉封闭 3 h,加兔抗人 Caspase-3 单克隆一抗(1:1 000),4 °C 冰箱过夜,TBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:30 000),室温下孵育 2 h,TBST 洗膜后加入化学发光试剂曝光,显影,定影后将胶片置于凝胶成像分析仪进行定量分析,用同样方法检测 β-actin 内参蛋白的表达。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-t 及 SNK-q 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞术检测各实验组对大鼠系膜细胞凋亡的影响 正常对照组大鼠系膜细胞的凋亡较少,其凋亡率为(2.66 ± 0.34)%。与正常对照组比较,A771726、LY294002、LY294002+A771726 组干预大鼠系膜细胞 48 h 后,其凋亡率均升高,凋亡率分别为(6.48 ± 0.37)%、(6.64 ± 0.37)%、(9.54 ± 0.50)%,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。与 A771726 组比较,LY294002 组干预系膜细胞 48 h 后细胞凋亡率无明显变化($P > 0.05$),而 LY294002+A771726 组干预系膜细胞 48 h 后细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与 LY294002 组比较,LY294002+A771726 组干预系膜细胞 48 h 后细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。



A: 正常对照组; B: A771726(50 μg/mL)组; C: LY294002(2 μg/mL)组; D: LY294002+ A771726 组。

图 1 各干预组作用系膜细胞 48 h 后对系膜细胞凋亡的影响

2.2 免疫荧光法检测各干预组系膜细胞中 mTOR 蛋白的表达情况 与正常对照组比较, A771726、LY294002、

LY294002+A771726 组干预大鼠系膜细胞 48 h 后,mTOR 荧光强度均明显下降,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。与

A771726 组比较, LY294002 组干预大鼠系膜细胞 48 h 后, mTOR 荧光强度无明显变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), LY294002 + A771726 组干预系膜细胞 48 h 后, mTOR 荧光强度明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 LY294002 组比较, LY294002 + A771726 组干预系膜细胞 48 h 后, mTOR 荧光强度亦明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1 及图 2。

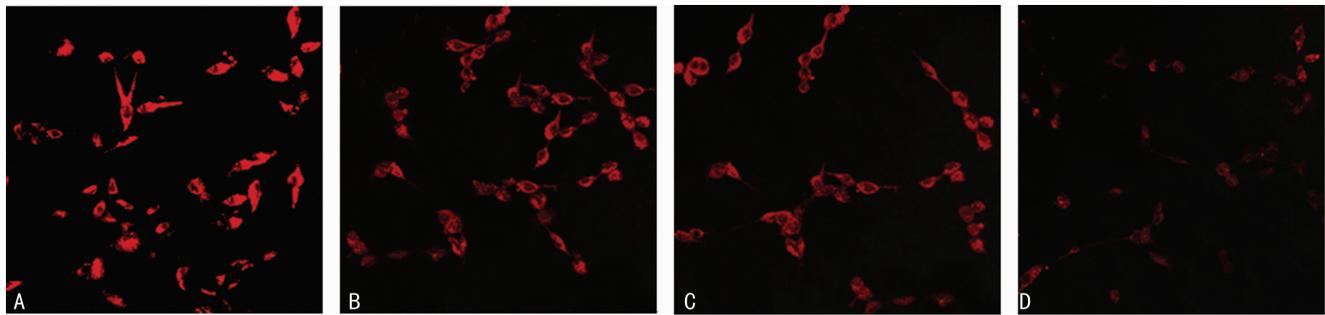
2.3 免疫印迹法检测各干预组系膜细胞中 Caspase-3 蛋白的表达情况 与正常对照组比较, A771726、LY294002、LY294002 + A771726 组干预大鼠系膜细胞 48 h 后, Caspase-3 蛋白表达均明显增加, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。与 A771726 组比较, LY294002 组干预大鼠系膜细胞 48 h 后, Caspase-3 蛋白表达无明显变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), LY294002 + A771726 组干预系膜细胞 48 h 后, Caspase-3 蛋白表达明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

与 LY294002 组比较, LY294002 + A771726 组干预系膜细胞 48 h 后, Caspase-3 蛋白表达亦明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2 及图 3。

表 1 各干预组作用系膜细胞 48 h 后对系膜细胞 mTOR 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | mTOR 荧光强度 |
|---------------------|-------------------|
| 正常对照组 | 1 075.65 ± 102.06 |
| A771726(50 μg/mL)组 | 673.43 ± 44.26▲ |
| LY294002(2 μg/mL)组 | 675.64 ± 46.12▲□ |
| LY2940002+A771726 组 | 522.32 ± 24.86▲■★ |
| F | 148.66 |
| P | <0.01 |

▲: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; □: $P > 0.05$, ■: $P < 0.05$, 与 A771726 组比较; ★: $P < 0.05$, 与 LY294002 组比较。



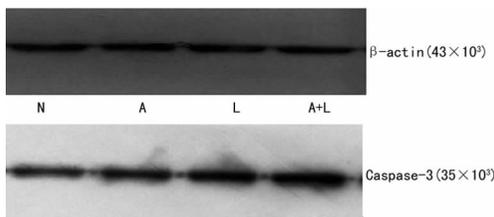
A: 正常对照组; B: A771726(50 μg/mL)组; C: LY294002(2 μg/mL)组; D: LY2940002+A771726 组。

图 2 各干预组作用系膜细胞 48 h 后系膜细胞 mTOR 蛋白表达情况 ($\times 100$)

表 2 各干预组作用系膜细胞 48 h 后系膜细胞 Caspase-3 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | Caspase-3 |
|---------------------|------------------|
| 正常对照组 | 0.741 ± 0.058 |
| A771726(50 μg/mL)组 | 1.907 ± 0.397▲ |
| LY294002(2 μg/mL)组 | 1.936 ± 0.157▲□ |
| LY2940002+A771726 组 | 2.850 ± 0.231▲■★ |
| F | 108.423 |
| P | <0.01 |

▲: $P < 0.05$, 与正常对照组比较; □: $P > 0.05$, ■: $P < 0.05$, 与 A771726 组比较; ★: $P < 0.05$, 与 LY294002 组比较。



N: 正常对照组; A: A771726 组; L: LY294002 组; A + L: LY2940002 + A771726 组。

图 3 各干预组作用系膜细胞 48 h 后对系膜细胞 Caspase-3 蛋白表达情况

3 讨论

正常情况下, 肾小球系膜细胞的增殖与凋亡均较少, 且二者处于动态平衡。当外界细胞因子、炎症介质等持续作用下,

系膜细胞增殖与凋亡的这种平衡将被打破, 特别系膜细胞将大量增殖, 而其凋亡将相应减少。研究发现, 系膜细胞的凋亡又对肾小球损伤的修复起关键作用。因此, 通过外界因素诱导系膜细胞凋亡, 可能是控制和治疗系膜增生性肾小球肾炎的重要靶点。

本研究通过体外培养正常大鼠肾小球系膜细胞, 予以不同干预因素作用相同时间后, 采用流式细胞术检测大鼠系膜细胞凋亡, 结果显示: 正常对照组大鼠系膜细胞凋亡率为 (2.66 ± 0.34) %。而与正常对照组比较, A771726 (50 μg/mL) 组大鼠系膜细胞的凋亡率从 (2.66 ± 0.34) % 升高为 (6.48 ± 0.37) %, 这说明来氟米特可明显诱导大鼠系膜细胞的凋亡。大量研究发现: PI3K/Akt/mTOR 信号通路活化可以抑制多种细胞凋亡、促进细胞周期及细胞增殖, 在细胞增殖与凋亡中起重要作用。张春江等^[7] 研究发现: 大鼠系膜细胞中存在 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 且该通路与肾小球系膜细胞增殖与凋亡密切相关。而 LY294002 是 PI3K 特异性阻断剂, 其可特异性阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路。本课题组应用 LY294002 干预大鼠系膜细胞 48 h 后, 系膜细胞的凋亡率从 (2.66 ± 0.34) % 升高为 (6.64 ± 0.37) %, 而 A771726 组、LY294002 组大鼠系膜细胞的凋亡率确无明显差异, 进一步在 LY294002 干预系膜细胞的基础上, 加用 A771726, 大鼠系膜细胞的凋亡进一步升高, 这说明 A771726 诱导大鼠系膜细胞的凋亡可能是通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路实现的, 且 A771726 可协同 LY294002 诱导大鼠系膜细胞的凋亡。

Caspases 家族作为凋亡调节基因, 在细胞中以无活性的酶

原形式存在,当凋亡机制启动后,形成具有活性的 Caspase。Caspase-3 被称为刽子手胱天蛋白酶,无论是在内在和外在的凋亡途径中都有 Caspase-3 的激活,激活的 Caspase-3 将导致一些结构和调节蛋白的裂解从而引起细胞凋亡^[8]。所以 Caspases-3 的表达增加,可以说标志着细胞内凋亡机制的启动。本研究发现,正常对照组中 Caspase-3 蛋白表达较低,而与正常对照组比较,A771726 组、LY294002 组中 Caspase-3 蛋白的表达明显增加,然而与 A771726 组比较,LY294002 组中 Caspase-3 蛋白的表达无明显变化,而 A771726 联合 LY294002 组中 Caspase-3 蛋白的表达较 A771726 组、LY294002 组明显增加,这进一步说明 A771726 可诱导大鼠系膜细胞的凋亡,且 A771726 可协同 LY294002 诱导大鼠系膜细胞的凋亡,因此笔者推测 A771726 诱导大鼠肾小球系膜细胞的凋亡可能是通过上调 Caspase-3 活性而实现的。

为进一步探讨 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在 A771726 对大鼠系膜细胞凋亡中的作用,本实验采用免疫荧光法检测 mTOR 蛋白的表达,结果显示:与正常对照组比较,A771726 组 mTOR 荧光强度明显减弱,而 LY294002 组 mTOR 荧光强度与 A771726 组无明显差异,这说明 A771726 可能是通过下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路而诱导大鼠系膜细胞凋亡。而 A771726 联合 LY294002 组 mTOR 荧光强度较 A771726 组、LY294002 组明显降低,这说明 A771726 可协同 LY294002 抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路。因此,笔者推测 A771726 可抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,且其作用靶点可能是 PI3K。

综上所述,A771726 可诱导大鼠肾小球系膜细胞的凋亡,其机制可能是通过下调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,且 A771726 可协同 LY294002 诱导大鼠系膜细胞的凋亡。

参考文献

[1] 程秋梅,潘延斌,谭美乐,等. 来氟米特对脂多糖诱导下

(上接第 1021 页)

- (Fuzi) of *Aconitum carmichaeli* Debx against severe-stage osteoarthritis model induced by mono-iodoacetate[J]. *J Ethnopharmacol*,2014,151(1):740-744.
- [7] Song X, Shen J, Wen H, et al. Impact of schistosoma japonicum infection on collagen-induced arthritis in DBA/1 mice; a murine model of human rheumatoid arthritis[J]. *PLoS One*,2011,6(8):e23453.
- [8] 郭静,勾向博,张文丽,等. 骨关节炎患者膝关节软骨和滑膜中 p38MAPK、NF- κ B 的表达及其意义[J]. *河北联合大学学报:医学版*,2013,15(6):749-751.
- [9] Chen LX, Lin L, Wang HJ, et al. Suppression of early experimental osteoarthritis by in vivo delivery of the adenoviral vector-mediated NF- κ Bp65-specific siRNA[J]. *Osteoarthritis Cartilage*,2008,16(2):174-184.
- [10] 陈连旭,于长隆. 腺病毒介导核因子 κ Bp65 特异性小干扰 RNA 抑制骨关节炎[J]. *中国组织工程研究*,2012,16(46):8551-8555.
- [11] Wang SJ, Guo X, Zuo H, et al. Chondrocyte apoptosis and expression of Bcl-2, Bax, Fas, and iNOS in articular carti-

lage in patients with Kashin-Beck disease[J]. *J Rheumatol*,2006,33(3):615-619.

- [12] Sena P, Manfredini G, Benincasa M, et al. Up-regulation of the chemo-attractive receptor ChemR23 and occurrence of apoptosis in human chondrocytes isolated from fractured calcaneal osteochondral fragments[J]. *J Anat*,2014,224(6):659-668.
- [13] Shakibaei M, John T, Seifarth C, et al. Resveratrol inhibits IL-1 beta-induced stimulation of caspase-3 and cleavage of PARP in human articular chondrocytes in vitro[J]. *Ann N Y Acad Sci*,2007(1095):554-563.
- [14] 王维山,史晨辉,李长俊,等. OA 患者关节液 uPA 和 MMP-3,9,13,14 的表达水平与关节功能的相关性研究[J]. *中国骨质疏松杂志*,2014,20(6):602-605,610.
- [15] 李卫平,蹇睿,胥方元. 超声波治疗兔膝骨关节炎对 MMP-1 和 MMP-13 表达的影响[J]. *重庆医学*,2012,41(16):1564-1566,封 2.

(收稿日期:2015-08-08 修回日期:2015-12-19)

(收稿日期:2015-09-16 修回日期:2015-11-08)